

Estudio funcional del 3'UTR del virus Chikungunya.

Volpe, S(1,2); Filomatori, CV(1).

(1) Instituto De Química y Físicoquímica Biológicas "Prof. Alejandro C. Paladini", UBA, CONICET; (2) Laboratorio de Virología Molecular, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, UNSAM, CONICET.

Contacto: *vlp.sebastiano@gmail.com*

El virus Chikungunya (CHIKV) es un patógeno humano reemergente transmitido por mosquitos. Tiene un genoma de ARN de polaridad positiva con dos marcos de lectura abiertos (ORFs). Cuando el virus infecta una célula, se sintetizan las proteínas del complejo de replicación (1er ORF). Las proteínas estructurales (2do ORF), se producen una vez sintetizado el ARN subgenómico. Las regiones no codificantes (UTRs) del genoma de los ARN-virus suelen contener secuencias y/o estructuras que regulan las etapas del ciclo de replicación. El 3'UTR contiene bloques de secuencias repetidas (DRs) cuyo número varía entre los linajes. La cepa Caribe que llegó a América en el 2013, tiene un 3'UTR largo, con tres copias de DR1+2 y dos de DR3. Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que cuando infectamos mosquitos con un virus que tiene un 3'UTR con la delección de las tres DR1+2 (Mini3') se afecta la transmisión viral y se seleccionan dentro del mosquito, variantes virales que incorporaron copias de DR3 (Ins3'). En este trabajo proponemos estudiar el efecto de Mini3' y de Ins3' sobre las etapas del ciclo viral. Para eso utilizamos un replicón del virus que contiene los genes de las luciferasas de Renilla (RLuc) y Firefly (FLuc) fusionados al 1er y 2doORF, respectivamente, las cuales nos permiten estimar los procesos de traducción y replicación del genoma viral y el ARN subgenómico. Mediante transcripción in vitro, sintetizamos moléculas de ARN del replicón salvaje, del Mini3' y del Ins3'. Luego, los transfectamos en células de mamífero y mosquito, y cuantificamos la actividad de ambas luciferasas en función del tiempo. En células de mamífero no detectamos diferencias en los niveles de actividad luciferasa de los replicones mutantes con respecto al salvaje. Contrariamente, en células de mosquito, el replicón Mini3' mostró valores de actividad de RLuc significativamente más bajos que el replicón salvaje, indicando que se afectó la traducción del genoma viral. Notablemente, los niveles de actividad de RLuc de Ins3' fueron mayores que los de Mini3', indicando que la inserción rescató parcialmente la capacidad de traducción del virus. Las DRs separan el codón de finalización de la traducción de secuencias esenciales ubicadas al final del 3'UTR. Por lo tanto, las DRs podrían funcionar como secuencia espaciadora o bien contener secuencias definidas importantes para la traducción viral. Para estudiar estas posibilidades, diseñamos un virus que tenía una secuencia no relacionada del mismo tamaño pero sin repeticiones, en reemplazo de las DRs. Realizamos curvas de crecimiento viral de esta mutante en células humanas y de mosquito. Observamos que la replicación del virus mutante es comparable a la del virus salvaje en células

humanas, pero está drásticamente retrasada en células de mosquito. Este resultado sugiere que las DRs tienen un papel dependiente de su secuencia, y es una primera evidencia de que podrían estar interactuando con algún factor celular específico.